

EA-IL-15 溶瘤腺病毒的构建及其对胶质瘤细胞特异性及有效性研究

季佳宇 王启俨 方 胜 田毅夫 刘福生 米蕊芳

摘 要 **目的** 构建插入 EA-IL-15 双基因的溶瘤腺病毒(oAD-EA-IL-15),探讨其在体外对胶质瘤细胞的杀伤效果和特异性。**方法** PCR 法将 EA-IL-15 双基因插入腺病毒穿梭载体 pXC1,将穿梭质粒 pXC1-EA-IL-15 及辅助质粒 pBHG loxΔE1,3 Cre 质粒共转染 HEK393 细胞,获得溶瘤腺病毒 oAD-EA-IL-15。通过 CCK-8 细胞毒性实验,测定细胞相对活性,绘制剂量反应曲线。**结果** 成功构建溶瘤腺病毒载体(oAD)及含 EA-IL-15 双基因的溶瘤腺病毒载体(oAD-EA-IL-15);体外包装获得相应的溶瘤腺病毒 oAD 和 oAD-EA-IL-15;oAD 对小鼠胶质瘤细胞 GL261 有明显杀伤作用($P < 0.05$),对小胶质细胞 BV2(非肿瘤细胞)的杀伤作用明显低于对 GL261($P < 0.05$),说明 oAD 具有特异性;oAD-EA-IL-15 和 oAD 分别感染 GL261、BV2 细胞,对于 GL261,oAD-EA-IL-15 的半抑制浓度(IC_{50})值为 $0.58 \times 10^7 \pm 1.30 \times 10^5$ PFU/ml 较 oAD 的 IC_{50} 值 $1.13 \times 10^7 \pm 1.98 \times 10^5$ PFU/ml 低,对肿瘤细胞的杀伤作用强于 oAD($P < 0.01$),对于 BV2,oAD-EA-IL-15 对其活性的影响低于 oAD($P < 0.01$),说明 oAD-EA-IL-15 病毒的特异性优于 oAD 病毒。**结论** 携带 EA-IL-15 双基因的溶瘤腺病毒在体外对胶质瘤细胞具有明显的杀伤作用和特异性,可为胶质瘤治疗提供更加特异有效的途径。

关键词 胶质瘤 溶瘤腺病毒 人内皮抑素 血管生成抑素 IL-15

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.10.012

Construction of the EA-IL-15 Oncolytic Adenovirus and Investigation on its Specificity and Efficacy in Glioma Cells. Ji Jiayu, Wang Qiyang, Fang Sheng, et al. Brain Tumor Research Center, Beijing Neurosurgical Institute, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100070, China

Abstract Objective To construct an oncolytic adenovirus carrying Endo-Angio (EA) and IL-15 double genes, and further investigate its specificity and cytotoxic effect to glioma cells in vitro. **Methods** EA and IL-15 genes were firstly obtained by PCR method, and inserted into the shuttle vector pXC1 through gene cloning approach. Then the shuttle plasmid pXC1-EA-IL-15 and the auxiliary plasmid pBHG loxΔE1,3 Cre plasmid were cotransfected into the HEK293 cells to form the oAD-EA-IL-15 adenovirus. The specificity and cytotoxic effect of the adenoviruses were evaluated by CCK-8 method and analyzed to draw the dose response curve according to the results. **Results** The oncolytic adenovirus vector (oAD) and the EA-IL-15 double gene (oAD-EA-IL-15) adenovirus vector were successfully constructed, and the corresponding adenoviruses were successfully obtained by virus packaging in vitro. oAD showed significantly inhibition effect on mouse glioma cells GL261 compared to the control group($P < 0.05$), while the cytotoxicity effect to microglia BV2 (non-tumor cells) was significantly weaker compared to GL261 group($P < 0.05$) which indicated the specificity of oAD. Furthermore, we detected the efficacy of oAD-EA-IL-15 and oAD on GL261 and BV2 cells respectively. The results showed oAD-EA-IL-15 had a stronger cytotoxicity effect than oAD on GL261 cells($P < 0.01$) and the half-inhibitory concentration (IC_{50}) value of oAD-EA-IL-15 ($0.58 \times 10^7 \pm 1.30 \times 10^5$ PFU/ml) was lower than the IC_{50} value of oAD ($1.13 \times 10^7 \pm 1.98 \times 10^5$ PFU/ml). Moreover, the cytotoxicity effect of the oAD-EA-IL-15 to BV2 cells was weaker than oAD($P < 0.01$), indicating oAD-EA-IL-15 had better specificity to glioma cells. **Conclusion** The oncolytic adenovirus carrying the EA-IL-15 double gene had significant specificity and cytotoxic effect in treating glioma cells in vitro, which could be a safer and more efficient approach in glioma therapy.

Key words Glioma; Oncolytic adenovirus; Endostatin; Angiostatin; IL-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81672478);北京市自然科学基金资助项目(7182026)

作者单位:100070 北京市神经外科研究所脑肿瘤研究中心、首都医科大学附属北京天坛医院

通讯作者:米蕊芳,电子信箱:miruifang2013@hotmail.com

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性颅内肿瘤之一,其中约 50% 为恶性程度极高的胶质母细胞瘤。由于其具有广泛浸润性、血-脑脊液屏障的保护及局部和系统性的免疫抑制,在经过手术、放疗和化疗等综合治疗后其中位生存期仅为 15 个月^[1,2]。溶

瘤病毒疗法 (oncolytic virus therapy) 是一种很有前途的癌症基因治疗疗法, 溶瘤病毒可以在恶性细胞中选择性复制, 导致癌细胞裂解, 同时释放肿瘤相关抗原 (TAAs)、病原相关分子模式 (PAMPS) 和危险相关分子模式 (DAMPS) 刺激肿瘤细胞的适应性免疫反应^[3,4]。

溶瘤腺病毒是最常见的溶瘤病毒之一, 通过对相关基因的修饰或改造, 溶瘤腺病毒可以在肿瘤细胞中进行特异性复制和裂解, 引起炎症反应促进免疫应答^[5]。在已经进行的临床试验中, 溶瘤腺病毒显示出令人满意的安全性^[6]。腺病毒具有高基因转导效率和遗传稳定性, 其结构和基因功能已经有了比较完善的描述, 对其进行修饰改造相对简单易行^[7,8]。然而, 由于实体肿瘤的结构复杂及肿瘤微环境的存在, 溶瘤病毒难以完全发挥作用。

人内皮抑素 (endostatin, Endo) 和血管生成抑素 (angiostatin, Angio) 作为一种融合的结构调节分子 Endo - Angio 能够有效抑制血管内皮细胞增生。Endo - Angio 融合蛋白能够抑制胶质瘤等肿瘤中新生血管的生长, 破坏肿瘤微环境, 且能够抑制肿瘤细胞的增殖并极少产生耐药性^[9]。有研究显示溶瘤病毒中插入人内皮抑素和血管生成抑素融合基因可以表达 Endo - Angio 融合蛋白, 能够显著抑制人脑微血管内皮细胞 (HBMEC) 的增殖^[10]。

人白介素 15 (IL - 15) 是一种免疫调节分子, 在淋巴细胞介导的肿瘤免疫应答过程中, IL - 15 可以促进 T 细胞增殖分化、B 细胞相关抗体的分泌。有研究显示, 在溶瘤性水疱性口炎病毒 (VSV) 中插入高分泌型 hIL - 15 感染肿瘤细胞, 被感染的 CT - 26 肿瘤细胞局部表达 IL - 15 明显增强, 导致 T 细胞的免疫反应增强^[11]。本研究通过构建携带 Endo - Angio、IL - 15 双基因的溶瘤腺病毒, 研究其在体外对胶质瘤细胞是否具有明显的杀伤作用和特异性。

材料与方法

1. 材料: GL261 细胞和永生化的胶质瘤细胞系 BV2 购自中国医学科学院。人神经胶质瘤细胞系 U251 从北京细胞库获得。DMEM 培养基、PBS 磷酸盐缓冲溶液、胰蛋白酶和双抗 (100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素) 购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, CCK - 8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司。溶瘤病毒载体由笔者实验室保存。

2. 溶瘤腺病毒载体及插入 EA - IL - 15 双基因的溶瘤腺病毒的构建: (1) 溶瘤腺病毒载体 (oAD):

去除腺病毒穿梭载体 pXC1, 在 E1A 区域添加 survivin 启动子, 删除 E1B 区域的 19kDa 区域。(2) 插入 EA - IL - 15 双基因的溶瘤腺病毒 (oAD - EA - IL - 15): PCR 的方法将 EA - IL - 15 双基因插入腺病毒穿梭载体 pXC1, Endo - Angio 基因和 IL - 15 基因中间通过核糖体进入位点 (IRES) 连接, 将穿梭质粒 pXC1 - EA - IL - 15 及辅助质粒 pBHG loxΔE1, 3 Cre 质粒共转染 HEK393 细胞, 得到溶瘤腺病毒 oAD - EA - IL - 15。

3. 细胞培养: GL261 小鼠胶质瘤细胞和 BV2 小鼠胶质细胞在常氧条件下用含有 10% 胎牛血清的 DMEM、1% 双抗的培养基置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。细胞用含有 0.05% 的胰蛋白酶液进行消化和传代。

4. 细胞加药实验: 取对数期细胞接种于 96 孔板中, 培养 24h, 按照不同 MOI 值加入病毒感染, 培养 72h 后观察细胞状态并定量分析细胞的相对活性。

5. CCK - 8 细胞毒性实验: 病毒感染 72h, 取出 96 孔板, 每孔加入 10μl CCK - 8 溶液, 37℃ 培养箱内孵育 2h, 酶标仪测定 450nm 处的吸光度。

6. 统计学分析: 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 构建溶瘤腺病毒载体 (oAD): 去除腺病毒穿梭载体 pXC1, 在 E1A 区域添加 survivin 启动子, 使其对肿瘤细胞具有特异性感染; 删除 E1B 区域的 19kDa 区域, 使得病毒获得诱导肿瘤细胞凋亡的能力, 并增加腺病毒的传播能力, 构建成溶瘤腺病毒载体 (oAD)。体外病毒包装得到空载溶瘤腺病毒 oAD。

2. 溶瘤腺病毒 oAD 对胶质瘤细胞的体外杀伤作用及特异性研究: 溶瘤腺病毒 oAD 感染胶质瘤细胞 GL261, 72h 后倒置显微镜下观察, 可见对照组细胞贴壁生长, 排列规则, 细胞密度大。实验组中随着 MOI 值的增高, 细胞密度减少, 细胞形态皱缩, 详见图 1。说明 oAD 对 GL261 细胞有一定的杀伤作用。将 oAD 同时作用于 GL261 细胞及小胶质细胞 BV2 (非肿瘤细胞)。感染 72h 后测定细胞相对活性, 可以看到与对照组 (PBS) 比较, oAD 对 GL261 具有明显的杀伤作用 ($P < 0.05$), 并且在不同 MOI 值病毒的作用下, oAD 对 GL261 的杀伤作用明显高

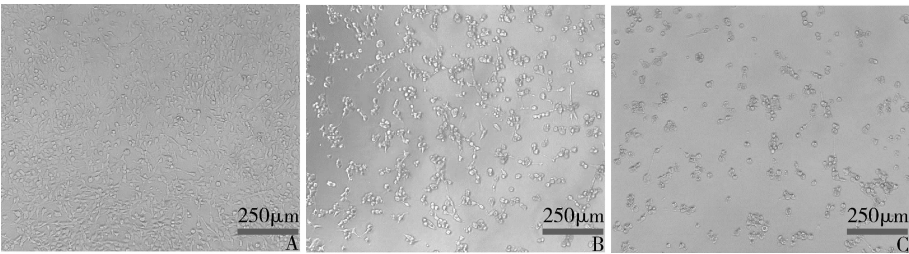


图1 倒置显微镜下观察空载溶瘤腺病毒(oAD)对胶质瘤细胞GL261形态的影响(×100)
A. 对照组;B. MOI=10 oAD处理组;C. MOI=100 oAD处理组

于对BV2,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),详见图2。

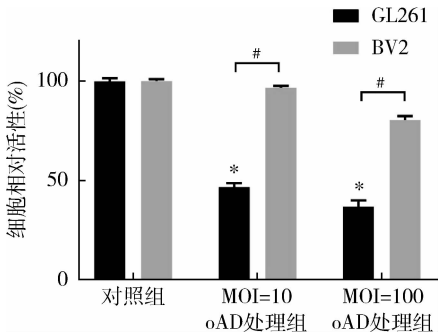


图2 空载溶瘤腺病毒(oAD)特异性及有效性分析
与对照组比较,* $P < 0.05$;GL261与BV2比较,# $P < 0.05$

3. 构建插入EA-IL-15双基因的溶瘤腺病毒(oAD-EA-IL-15):为了增强溶瘤病毒对胶质瘤细胞的杀伤作用,笔者将Endo-Angio及IL-15基因定向克隆构建到溶瘤腺病毒oAD的腺病毒穿梭载体pXC1中,构建成EA-IL-15双基因腺病毒载体pXC1-EA-IL-15。PCR的方法检测所插入的基

因,可见挑取的8个克隆株中有7个携带有EA-IL-15基因,详见图3。Endo-Angio基因和IL-15基因中间通过核糖体进入位点(IRES)连接,可同时表达,详见图4。笔者进一步将穿梭质粒pXC1-EA-IL-15及辅助质粒pBHG loxΔE1,3Cre质粒共转染HEK393细胞,得到溶瘤腺病毒oAD-EA-IL-15。

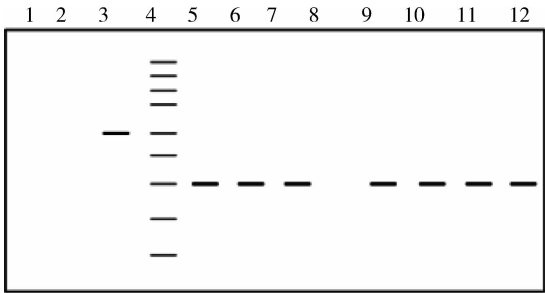


图3 插入EA-IL-15双基因转化子PCR鉴定分析
1. 空白对照组;2. 阴性对照;3. 阳性对照;4. 250bp DNA Ladder
(自上至下:5kb、3kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp);5~12. 1~8号克隆转化子

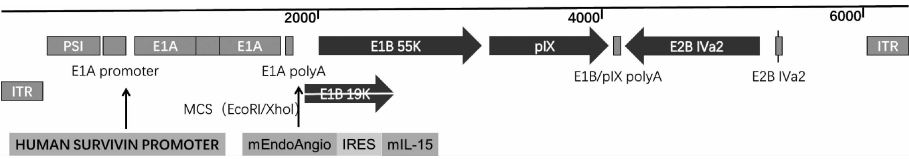


图4 插入EA-IL-15双基因的腺病毒穿梭载体pXC1结构

4. 插入EA-IL-15双基因的溶瘤腺病毒(oAD-EA-IL-15)对胶质瘤细胞的体外杀伤作用及特异性研究:统一两病毒效价,将oAD-EA-IL-15及oAD溶瘤病毒分别感染GL261细胞,感染72h后测定细胞的相对活性,绘制剂量反应曲线。可见随着溶瘤病毒浓度的增加,GL261细胞相对活性不断下降。说明两种溶瘤病毒对GL261细胞均有杀伤作用($P < 0.01$),其中oAD-EA-IL-15对GL261细胞的杀

伤作用明显优于oAD($P < 0.01$),详见图5。oAD-EA-IL-15对GL261细胞的半抑制浓度(IC_{50})值为 $0.58 \times 10^7 \pm 1.30 \times 10^5$ PFU/ml,低于oAD的 IC_{50} 值 $1.13 \times 10^7 \pm 1.98 \times 10^5$ PFU/ml($P < 0.01$),说明oAD-EA-IL-15对肿瘤细胞的杀伤作用强于oAD。

将oAD-EA-IL-15及oAD溶瘤病毒分别感染小胶质细胞(非肿瘤细胞)BV2。72h后在不同剂

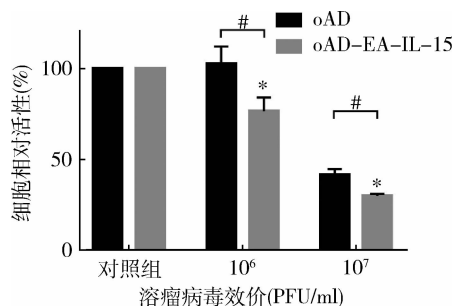


图5 双基因溶瘤腺病毒对小鼠胶质瘤 GL261 细胞作用分析

与对照组比较, * $P < 0.01$; # $P < 0.01$

量下测定细胞的相对活性, 详见图 6。可以看到 oAD-EA-IL-15 ($P < 0.05$) 对其活性的影响低于 oAD ($P < 0.01$)。在病毒效价同为 10^8 PFU/ml 时, oAD-EA-IL-15 感染下的 BV2 细胞相对活性高于 oAD ($P < 0.01$), 说明 oAD-EA-IL-15 病毒的特异性优于 oAD 病毒。

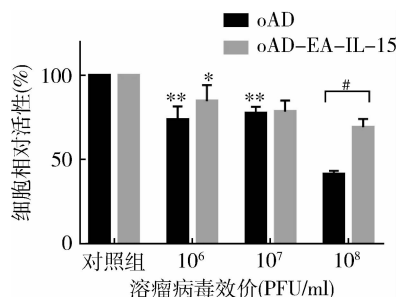


图6 双基因溶瘤腺病毒特异性分析

oAD 及 oAD-EA-IL-15 病毒对 BV2 细胞的作用。

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; # $P < 0.01$

讨 论

笔者在构建溶瘤腺病毒载体的时候选择在 E1A 区添加特异性启动子, 特异性的肿瘤组织启动子可以控制病毒增殖必需基因的表达, 从而获得病毒对肿瘤细胞的选择性复制^[12]。肿瘤特异性启动子包括 survivin 启动子、环氧化酶 (COX-2) 启动子、hTERT 启动子等。笔者选用的 survivin 启动子在 80% 的胶质母细胞瘤肿瘤细胞中有丰富的表达, 且其阳性肿瘤样本的比例与胶质瘤的组织学分级存在明显的相关性^[13]。此外, 笔者还删除了 E1B-19k 区域, 该区域所编码产物功能类似于抗凋亡因子 Bcl-2 可以抑制 Bax 和 TNF 发挥抗凋亡作用, 19k 的缺失能够协同溶瘤腺病毒在肿瘤细胞中特异性复制, 增强病毒传播能力^[14]。在溶瘤腺病毒载体的基础上笔者补充了结构调节基因 Endo-Angio 和免疫调节基因 IL-15, 希望

病毒本身的溶瘤作用和外源基因的治疗作用协同, 增强病毒的扩散及对肿瘤的杀伤能力。

在体外实验中可见, oAD-EA-IL-15 和 oAD 对于肿瘤细胞均具有特异性的杀伤效果。对于肿瘤细胞, oAD-EA-IL-15 的杀伤效果更好, 对于非肿瘤细胞, oAD-EA-IL-15 有更好的特异性, 在溶瘤病毒的体内治疗过程中, 更好的特异性就意味着更好的安全性, 加强患者的预后。

在面对体内的实体肿瘤中, 肿瘤中存在不支持溶瘤腺病毒的复制的缺氧区域、相关成纤维细胞的积累、致密的细胞外基质和新生血管的形成都可以阻碍溶瘤腺病毒的传播^[8]。对此, 通过构建携带 Endo-Angio 基因的溶瘤腺病毒, 来达到抑制新生血管形成的作用, 一方面在结构上减少实体肿瘤的复杂程度; 另一方面减少肿瘤组织的血供, 导致未感染的肿瘤细胞凋亡 (旁观者杀伤效应), 从而抑制肿瘤的生长^[15]。肿瘤周围还有肿瘤微环境, 其中往往含有对溶瘤病毒有杀伤作用的自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞, 阻碍溶瘤病毒扩散的肿瘤基质等非肿瘤细胞、可以抵消溶瘤腺病毒免疫刺激优势的 Tregs、MDSCs 等抑制性免疫细胞^[16]。IL-15 是 NK 细胞、自然杀伤类细胞以及 CD44 高表达 CD8⁺ T 细胞激活的必需因子, 通过活化 NK 细胞可以增强抗肿瘤活性, 且不会增加 Tregs 细胞的数量和活性^[17,18]。IL-15 还可以通过调节肿瘤微环境的组织间隙来促进溶瘤病毒的扩散, 并且可以增加血管抑制性药物的抗血管作用^[19]。

综上所述, 本研究成功构建了溶瘤腺病毒载体 (oAD) 及 oAD-EA-IL-15 溶瘤病毒, 并且体外实验的结果表明, oAD-EA-IL-15 溶瘤病毒对胶质瘤细胞 GL261 有明显的杀伤作用, 同时具有一定的特异性。本研究为 oAD-EA-IL-15 溶瘤病毒对胶质瘤及其他实体肿瘤的治疗研究提供了良好的实验依据。

参考文献

- Foreman PM, Friedman GK, Cassady KA, et al. Oncolytic virotherapy for the treatment of malignant glioma [J]. Neurotherapeutics, 2017, 14(2): 333-344
- Iorgulescu JB, Reardon DA, Chiocca EA, et al. Immunotherapy for glioblastoma: going viral [J]. Nat Med, 2018, 24(8): 1094-1096
- Parker JN, Bauer DF, Cody JJ, et al. Oncolytic viral therapy of malignant glioma [J]. Neurotherapeutics, 2009, 6(3): 558-569
- Roswell Shaw A, Suzuki M. Oncolytic viruses partner with T-cell therapy for solid tumor treatment [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2103
- Shaw AR, Suzuki M. Immunology of adenoviral vectors in cancer ther-

- apy [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 15: 418–429
- 6 Philbrick B, Adamson DC. DNX – 2401: an investigational drug for the treatment of recurrent glioblastoma [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28(12): 1041–1049
- 7 McKenna MK, Rosewell – Shaw A, Suzuki M. Modeling the efficacy of oncolytic adenoviruses in vitro and in vivo: current and future perspectives [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(3): 619
- 8 Rosewell Shaw A, Suzuki M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 21: 9–15
- 9 Zhang G, Jin G, Nie X, *et al.* Enhanced antitumor efficacy of an oncolytic herpes simplex virus expressing an endostatin – angiostatin fusion gene in human glioblastoma stem cell xenografts [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95872
- 10 Zhu G, Su W, Jin G, *et al.* Glioma stem cells targeted by oncolytic virus carrying endostatin – angiostatin fusion gene and the expression of its exogenous gene in vitro [J]. *Brain Res*, 2011, 1390: 59–69
- 11 Stephenson KB, Barra NG, Davies E, *et al.* Expressing human interleukin – 15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of anti – tumor immunity [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(4): 238–246
- 12 Hardcastle J, Kurozumi K, Chiocca EA, *et al.* Oncolytic viruses driven by tumor – specific promoters [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7(2): 181–189
- 13 Van Houdt WJ, Haviv YS, Lu B, *et al.* The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma [J]. *J Neurosurg*, 2006, 104(4): 583–592
- 14 Baird SK, Aerts JL, Eddaoudi A, *et al.* Oncolytic adenoviral mutants induce a novel mode of programmed cell death in ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(22): 3081–3090
- 15 Vaha – Koskela MJ, Kallio JP, Jansson LC, *et al.* Oncolytic capacity of attenuated replicative semliki forest virus in human melanoma xenografts in severe combined immunodeficient mice [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14): 7185–7194
- 16 Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61–68
- 17 Zhang Y, Tian S, Liu Z, *et al.* Dendritic cell – derived interleukin – 15 is crucial for therapeutic cancer vaccine potency [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(10): e959321
- 18 Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, *et al.* Transgenic expression of IL15 improves antiglioma activity of IL13Ralpha2 – CAR T cells but results in antigen loss variants [J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(7): 571–581
- 19 Garofalo S, D’alessandro G, Chece G, *et al.* Enriched environment reduces glioma growth through immune and non – immune mechanisms in mice [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6623

(收稿日期: 2020 – 04 – 30)

(修回日期: 2020 – 05 – 07)

(上接第 46 页)

- 8 Comin – Colet J, Enjuanes C, Gonzalez G, *et al.* Iron deficiency is a key determinant of health – related quality of life in patients with chronic heart failure regardless of anaemia status [J]. *Euro J Heart Fail*, 2013, 15(10): 1164–1172
- 9 Beard J. Iron Deficiency alters brain development and functioning. [J]. *J Nutr*, 2003, 133(5): 1468S–1472S
- 10 David V, Martin A, Isakova T, *et al.* Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(1): 135–146
- 11 Samira Lakhal – Littletona, Alexi Crosbyb, Matthew C Frisea, *et al.* Intracellular iron deficiency in pulmonary arterial smooth muscle cells induces pulmonary arterial hypertension in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(26): 13122–13130
- 12 Geoffrey Charles – Edwards, Nelson Amaral, Alison Sleight, *et al.* Effect of iron isomaltoside on skeletal muscle energetics in patients with chronic heart failure and iron deficiency: FERRIC – HF II randomized mechanistic trial [J]. *Circulation*, 2019, 139(21): 2386–2398
- 13 Vasquez – Trincado C, Garcia – Carvajal I, Pennanen C, *et al.* Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2016, 594(3): 509–525
- 14 Schorr S, Van Der Laan M. Integrative functions of the mitochondrial contact site and cristae organizing system [J]. *Semin Cell Devel Biol*, 2018, 76: 191–200
- 15 Scheede – Bergdahl C, Bergdahl A. Adaptation of mitochondrial expression and ATP production in dedifferentiating vascular smooth muscle cells [J]. *Canadian J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(12): 1473–1479
- 16 Dmitry BZ, Magdalena J, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS – Induced ROS release [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909–950
- 17 Lu QB, Wan MY, Wang PY, *et al.* Chicoric acid prevents PDGF – BB – induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFkappaB/mTOR/P70S6K signaling cascade [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 656–668

(收稿日期: 2020 – 04 – 12)

(修回日期: 2020 – 04 – 29)